No 12. **P. S. Chen,** Zürich. — Trennung der Blutproteine von *Drosophila-* und *Culex*-Larven mittels Stärke-Gel-Elektrophorese [1]. (Mit 4 Textabbildungen.)

Aus dem zoologisch-vergl.-anatomischen Institut der Universität Zürich.

Frühere Untersuchungen am Eiweisstoffwechsel von *Drosophila melanogaster* zeigten, dass die Blutkonzentration der freien Aminosäuren im Verlaufe der Larvalentwicklung absinkt (Hadorn und Stumm-Zollinger 1953, Chen und Hadorn 1954), während der Gehalt an Hämolympheproteinen sukzessiv zunimmt (Chen 1956). Bei der Mutante *letal-translucida* konnte festgestellt werden, dass der *ltr*-Faktor sich störend im Eiweisstoffwechsel auswirkt: das Blut der *ltr*-Homozygoten ist im Vergleich zu gleichalterigen Normalen viel reicher an Aminosäuren (Hadorn und Mitchell 1951, Hadorn und Stumm-Zollinger 1953, Stumm-Zolliger 1954) und eindeutig ärmer an Proteinen (Chen 1956).

Bei den Stechmücken-Larven (*Culex pipiens* und *C. fatigans*) ist ebenfalls ein Anstieg der Blutproteine mit zunehmendem Entwicklungsalter feststellbar (Chen 1959). Ihr Gehalt an freien Aminosäuren bleibt aber im Gegensatz zu *Drosophila*-Larven nahezu konstant. Die vorläufige biochemische Analyse der Mutante „*mel*" von *Culex pipiens* ergab, dass die Totalkonzentration der Ninhydrin-positiven Substanzen in den letalen Larven bis auf etwa 70% des normalen Gehaltes herabgesetzt ist (Larven und Chen 1956). Dies bedeutet, dass der *mel*-Faktor ebenfalls störend in den Eiweissstoffwechsel eingreift.

Bei den bisherigen Untersuchungen der Blutproteine wurde stets die Papierelektrophorese angewandt. Dabei wurden zwei Eiweissfraktionen bei *Drosophila*-Larven nachgewiesen: die B-Fraktion wandert bei pH 8,6 langsamer anodenwärts und kommt in viel konzentrierterer Form vor als die A-Fraktion (Wunderly

[1] Ausgeführt und herausgegeben mit Unterstützung durch die Karl-Hescheler-Stiftung und den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung. Herzlichen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. E. Hadorn für die Anregungen zu dieser Arbeit.

und Gloor 1953, Chen 1956). Bei den Culexlarven wurde nur eine Fraktion registriert (Chen 1959). Nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit und ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) scheint diese Fraktion mit der B-Fraktion von *Drosophila* identisch zu sein. Im Hinblick auf die entwicklungsphysiologische Deutung des Proteinstoffwechsels und die biochemische Auswirkung der Mutationen, erscheint es wünschenswert, die Blutproteine beider Insektengruppen mit einem weiteren speziellen Verfahren zu isolieren und die aufgetrennten Fraktionen möglichst genau zu identifizieren.

Smithies (1955 *a*) hat zum ersten Mal die Stärkegel-Elektrophorese für die Trennung der Proteine im Blutserum eingeführt. Dabei wurden neben dem Albumin und den Globulinen noch andere bisher unbekannte Fraktionen entdeckt (Smithies 1955 *b*; Smithies und Walker 1955, 1956; Smithies und Poulik 1956). Hunter und Markert (1957) kombinierten diese Methode mit histochemischer Technik, um verschiedene Fermente im Gewebehomogenat aufzutrennen und nachzuweisen. Mit Hilfe der Stärkegel-Elektrophorese isolierte Denucé (1957, 1958) eine Anzahl von Eiweisskomponenten im Blut von *Galleria mellonella*, *Macrothylacia rubi*, *Bombyx mori* und *Dytiscus marginalis*. Neuerdings benutzten Fine und Burstein (1959) diese Technik, um Lipoproteine im Blutserum nachzuweisen. Die Stärkegel-Elektrophorese zeichnet sich durch ihre geringe Adsorption und ihr grosses Auflösungsvermögen aus. Im folgenden geben wir einige vorläufige Ergebnisse über die Trennung der Blutproteine von *Drosophila*- und *Culex*-Larven mittels dieser Methode an.

Material und Methode

Als Versuchsmaterial dienten 72- und 96- stündige +/+- und *ltr/ltr*- Larven von *Drosophila melanogaster*. Untersucht wurden ferner die verpuppungsreifen Larven von *Culex pipiens* (autogene Form). Die Zuchttechnik dieser Larventypen wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (siehe Chen 1956, 1959).

Die als Trägermedium verwendete Kartoffelstärke wurde zuerst im Azeton mit Zugabe von konzentrierter Salzsäure bei 37°C während einer Stunde und 15 Minuten hydrolysiert (siehe Smithies 1955 *b* und C. L. Markert *). Nach dem Neutralisieren mit 1 M Natriumazetat wurde die Stärke filtriert, mit destilliertem Wasser und Azeton gründlich

* Nach einer persönlichen Information, die ich bestens verdanke.

gewaschen und bei 45°C getrocknet. Für die Herstellung des Stärkegels wurden 15 gr hydrolysierte Stärke mit 100 ml einer 0,03 M Boratpufferlösung (pH 8,5) gemischt, und die Stärkelösung zum Sieden gebracht. Nach dem Absaugen der Luftblasen mit der Wasserstrahlpumpe wurde die Lösung in eine aus einer Glasplatte und Plexiglasstreifen zusammengesetzte Form (185 × 30 × 6 mm) gegossen und sofort mit einem Polyaethylenstreifen zugedeckt. Das Stärkegel wurde während einiger Stunden bei ca 4°C abgekühlt, bis es die geeignete Konsistenz erreicht hatte.

Für das Auftragen der zu untersuchenden Hämolymphe wurde zunächst eine schmale Spalte von 20 mm Länge quer zur Laufrichtung ins Stärkegel geschnitten. Ein kleines Stück Filterpapier (16 × 4 mm, Whatman Nr. 1), das die Blutprobe enthielt, wurde vorsichtig in die geschnittene Spalte eingeschoben. Nach unserer Erfahrung genügen 15—20μl Hämolymphe für eine elektrophoretische Analyse. Da das Insektenblut in der Luft Pigment bildet, welches auf die Trennung der Eiweisskomponenten störend wirkt, wurde die Hämolymphe vor dem Auftragen auf das Filterpapier mit KCN behandelt (siehe Chen 1956). Der so vorbereitete Stärkestreifen wurde in einen Elphorapparat eingelegt. Für die Auftrennung der Proteine benutzten wir eine Spannung von 140 V und eine Stromstärke von 7 mA. Nach 12 Stunden wurde die Elektrophorese unterbrochen.

Der Stärkestreifen wurde horizontal durchgeschnitten und mit gesättigter Amidoschwarzlösung gefärbt. Der angefärbte Streifen wurde so lange in einem Gemisch von Methanol-Wasser-Eisessig (5: 5: 1) gewaschen, bis die aufgetrennten Proteinfraktionen deutlich zu sehen waren.

Ergebnisse und Diskussion

Unsere vorläufigen Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die Hämolympheproteine der verpuppungsreifen *Drosophila*-Larven des Wildstamms Sevelen durch Stärkegel-Elektrophorese mindestens in sieben Fraktionen zerlegt werden können (Abb. 1 *b*). Bei pH 8,5 wandern alle Fraktionen anodenwärts. Dieses Verhalten ist mit den früheren Feststellungen von Wunderly und Gloor (1953) und Chen (1956) durchaus vereinbar, wonach der IEP der Bluteiweisse von *Drosophila*-Larven bei pH 6,1—7,1 liegt. Wie aus dem angefärbten Stärkegel ersichtlich ist, sind zwei Hauptfraktionen (B_3, B_4) besonders konzentriert. Sie zeichnen sich durch zwei scharf abgegrenzte Streifen aus.

Es stellt sich nun die Frage, welche von diesen Eiweisskomponenten der früher auf dem papierelektrophoretischen Wege gefundenen A-Fraktion und welche der B-Fraktion entsprechen

(siehe S. 280). Um dies abzuklären, wurden die Blutproteine zuerst mittels Papierelektrophorese in ihre zwei Hauptanteile aufgetrennt (vgl. CHEN 1956). Anschliessend wurde das Papierelektrophero-gramm in der Längsrichtung halbiert. Der eine Teil wurde mit Bromphenolblau gefärbt, um die Proteinfraktionen zu lokalisieren, und aus dem anderen Teil wurde ein Papierstreifen aus jeder der zerlegten Proteinfraktion herausgeschnitten und einzeln im Stärkegel

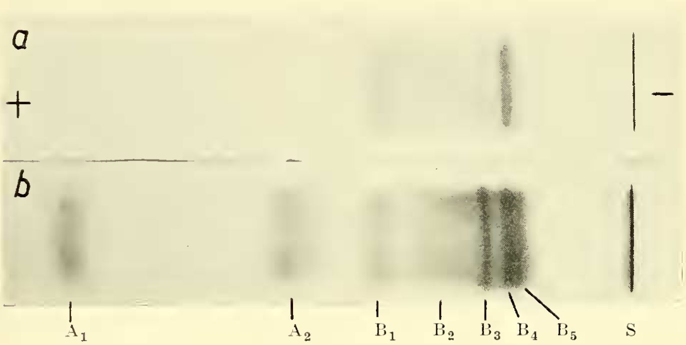


ABB. 1.

Auftrennung der Blutproteine von normalen *Drosophila*-Larven im Stärke-Gel. Es wurde je 20 µl Hämolymphe an der Startlinie (s) aufgebracht. *a*: aus 72-stündigen Larven; *b*: aus 96-stündigen Larven.

auf die enthaltenen Eiweisse hin untersucht. Aus einer solchen Versuchsanordnung ergab sich, dass die beiden der Anode näher stehenden Komponenten (A_1, A_2) aus der A-Fraktion stammen, während die übrigen (B_{1-5}) der B-Fraktion angehören. Somit wird nachgewiesen, dass jede der auf dem papierelektrophoretischen Wege zerlegten Fraktionen einen Komplex darstellt, der aus zwei bzw. fünf Eiweisskomponenten besteht.

Der Vergleich der Blutkonzentration zwischen 72- und 96-stündigen Larven ergab, dass der Proteingehalt mit zunehmendem Entwicklungsalter erhöht wird (vgl. Abb. 1 *a* und *b*). Beim Verwenden gleicher Hämolymphemenge (20 µl) wurden bei 72-stündigen Larven nur vier Komponenten festgestellt. Sie sind auch bedeutend schwächer in der Farbintensität im Vergleich zur gleichen Blutmenge 96-stündiger Individuen. Diese Tatsache steht in Übereinstimmung mit dem früheren Befund, wonach bei 72-

stündigen Larven nur die B-Fraktion festgestellt wurde (vgl. Abb. 2, in CHEN 1956).

Aus der Farbintensität des angefärbten Stärkegels erkennt man, dass das Konzentrationsverhältnis der einzelnen Fraktionen sich im Verlaufe der Larvalentwicklung ändert. Bei 72 Std erweist sich die B_4-Fraktion als recht konzentriert, während die B_3-Fraktion bloss einen schwachen Streifen bildet. Bei 96 Std zeigen sowohl B_3

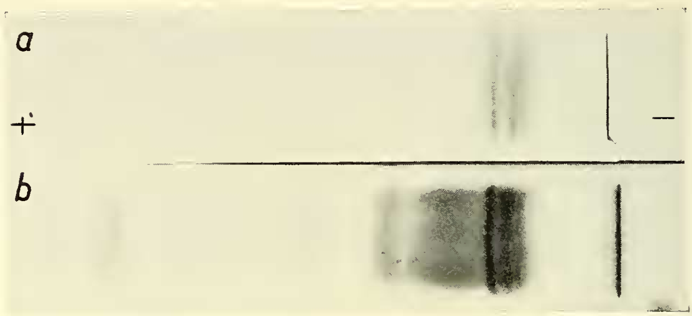


ABB. 2.
Vergleich des Proteingehaltes im Blut (20 μl) von 120-stündigen ltr/ltr-Larven (*a*) und 96-stündigen normalen Larven (*b*).

wie auch B_4 eine starke Färbung. Im papierelektrophoretischen Diagramm fand CHEN (1956), dass zwischen 72 und 96 Std der Gehalt an B-Fraktion um das Neunfache erhöht wird. Nach der vorliegenden Feststellung wäre diese Erhöhung grösstenteils auf die Zunahme der B_3-Fraktion zurückzuführen.

Die Untersuchung der Mutante *letal-translucida* mittels Stärkegel-Elektrophorese bestätigte ebenfalls das frühere Ergebnis (CHEN 1956). Die letalen *ltr/ltr*—Larven weisen im Vergleich zu normalen Individuen des entsprechenden entwicklungsphysiologischen Stadiums einen auffallend niedrigen Proteingehalt auf (Abb. 2 *a* und *b*). Die B_3- und B_4-Fraktionen bilden zwar noch zwei deutlich abgegrenzte Streifen auf dem Stärkegel, jedoch sind sie wesentlich schwächer in ihrer Farbintensität im Vergleich zu den entsprechenden Fraktionen der Normalen. Nach der Papierelektrophorese kommt bei *ltr/ltr*-Larven die A-Fraktion auch in nachweisbarer Menge vor (CHEN 1956). Weitere Untersuchungen mit grösseren Hämolymphemengen sollen zeigen, ob alle in den Nor-

malen vorkommenden Komponenten auch in den Letalen gebildet werden. Über die möglichen Störungsursachen des Proteinstoffwechsels bei der vorliegenden Mutante wurde bereits in verschiedenen Arbeiten eingehend diskutiert (Gloor 1949; Hadorn 1949, 1954, 1955, 1956; Chen 1956).

Die Stärkegel-Elektrophorese an Stechmücken-Larven (*Culex pipiens* und *C. fatigans*) ergab, dass ihre Blutproteine zumindest in vier Fraktionen zerlegbar sind (Abb. 3). Auf dem angefärbten



Abb. 3.
Auftrennung der Proteine in 20 µl Hämolymphe verpuppungsreifer Larven von *Culex pipiens*.

Stärkestreifen sind drei deutlich aufgetrennte Komponenten erkennbar. Unter günstigen Bedingungen konnten sogar vier Fraktionen festgestellt werden (Abb. 4 *b*). Ausserdem kommt oft noch eine Komponente vor, die einen schwachen diffusen Streifen bildet und wesentlich schneller zur Anode wandert als die übrigen. Dies bedeutet, dass die auf dem papierelektrophoretischen Wege isolierte Proteinfraktion keineswegs einheitlich ist.

Auf Grund des IEP-Wertes und der Beweglichkeit in der Papierelektrophorese scheint der Hauptanteil der Blutproteine von Culexlarven mit der B-Fraktion von *Drosophila* identisch zu sein (Chen 1959). Die Auftrennung der Blutproteine im Stärkegel beweist jedoch, dass die Culiciden ein ganz anderes Muster besitzen als die *Drosophila*-Larven (Abb. 4 *a* und *b*). Die konzentrierteste Proteinfraktion der Culexhämolymphe hat eine annähernd gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie die B_5-Fraktion des Drosophilablutes. Bei den Stechmücken befinden sich die übrigen Fraktionen stets zwischen der Startlinie und der Hauptfraktion, während die Proteinkomponenten von *Drosophila* ein völlig verschiedenes Verteilungsmuster aufweisen.

Immunologische Untersuchungen dürften darüber Aufschluss geben, ob die beiden Larventypen überhaupt gemeinsame Proteinfraktionen besitzen.

Wie bereits erwähnt, ist die Stärkegel-Elektrophorese durch ihr besonders grosses Auflösungsvermögen gekennzeichnet. Der Auftrennungsmechanismus beruht teils auf der Beweglichkeit der Eiweissteilchen im elektrischen Feld, teils auf der Porengrösse des



Abb. 4.

Vergleich des Proteinmusters in 20 μl Hämolymphe verpuppungsreifer Larven von *Drosophila melanogaster* (*a*) und *Culex pipiens* (*b*).

Stärkegels. Das Trägermedium wirkt wie ein Ultrafilter, durch welches die Proteinmoleküle nach ihrer Grösse aufgeteilt werden. Dies besagt aber nicht, dass die im Stärkegel aufgetrennten Komponenten einheitlich sind. Neuerdings berichteten Fine und Loeb (1959), dass die mittels Stärkegel-Elektrophorese isolierten Eiweissfraktionen des Blutserums nach ihrem immunologischen Verhalten als heterogen anzusehen sind. Weitere Untersuchungsmethoden, wie die Immunoelektrophorese (Wunderly 1957), sollten uns wertvolle Auskünfte über die Homogenität der hier beschriebenen Fraktionen geben.

Summary

1. Zone electrophoresis in starch gels has been used to study the proteins in the larval hemolymph of *Drosophila melanogaster* and *Culex pipiens* (autogenous form). By this method it was found that the blood proteins of the normal genotype of *Drosophila*

larvae can be separated into at least seven fractions. Two of them (A_{1-2}) correspond to the so-called A-fraction and the other five components (B_{1-5}) to the B-fraction reported in previous studies where paper electrophoresis was used (Wunderly and Gloor 1953, Chen 1956). In agreement with the earlier investigation (Chen 1956) it has been shown that there is an increase of protein content in the body fluid of normal larvae with the advance of age.

2. The electropherograms indicate that the lethal *ltr/ltr*-larvae have a much lower protein concentration upon comparing with normal (+/+) individuals of corresponding developmental stage. The same result has been reached in a previous study (Chen 1956). Further investigation is needed to see if all „normal„ protein components are present in the lethal *ltr*-homozygotes.

3. The blood proteins of *Culex* larvae can be separated into at least four components in starch gels. This shows clearly that the protein fraction isolated previously by paper electrophoresis is not homogenous (see Chen 1959). The starch gel electropherograms also revealed that the patterns of blood proteins in *Drosophila* and *Culex* larvae are entirely different. More detailed quantitative analysis of these protein components is still in progress.

LITERATURVERZEICHNIS

Chen, P. S. 1956. *Elektrophoretische Bestimmung des Proteingehaltes im Blut normaler und letaler (ltr) Larven von Drosophila melanogaster.* Rev. suisse Zool. 63: 216.

— 1959. *Studies on the protein metabolism of Culex pipiens L. — III. A comparative analysis of the protein contents in the larval haemolymph of autogenous and anautogenous forms.* J. Insect Physiol. (im Druck).

— und E. Hadorn. 1954. *Vergleichende Untersuchungen über die freien Aminosäuren in der larvalen Hämolymphe von Drosophila, Ephestia und Corethra.* Rev. suisse Zool. 61: 437.

Denucé, J. M. 1957. *Über die Trennung von Hämolymphe-Proteinen mittels einer modifizierten Stärke-Elektrophorese-Methode.* Z. Naturforschg. 12 *b*: 434.

— 1958. *Zonenelektrophoretische Untersuchungen der Hämolymphe-Proteine von Insekten in verschiedenen Stadien der Larvenentwicklung.* Z. Naturforschg. 13 *b*: 215.

Fine, J. M. und M. Burstein. 1958. *Electrophorèse sur gel d'amidon des lipoprotéines sériques humaines.* Experientia 14: 411.

— und J. Loeb. 1959. *Analyses immunoélectrophorétiques des fractions protéiques du sérum humain séparées par électrophorèse en gel d'amidon.* Experientia 15: 59.

Gloor, H. 1949. *Biochemische Untersuchungen am Letalfaktor „letal-translucida" (ltr) von Drosophila melanogaster.* Rev. suisse Zool. 56: 281.

Hadorn, E. 1949. *Zur Entwicklungsphysiologie der Mutante „letal-translucida" (ltr) von Drosophila melanogaster.* Rev. suisse Zool. 56: 271.

— 1954. *Approaches to the study of biochemical and developmental effects of mutations.* Caryologia, Suppl. 6: 326.

— 1955. *Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für die Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung.* Stuttgart.

— 1956. *Patterns of biochemical and developmental pleiotropy.* Cold Spr. Harb. Sym. Quant. Biol. 21: 363.

— und H. K. Mitchell. 1951. *Properties of mutants of Drosophila melanogaster and changes during development as revealed by paper chromatography.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 37: 650.

— und E. Stumm-Zollinger. 1953. *Untersuchungen zur biochemischen Auswirkung der Mutation „letal-translucida" (ltr) von Drosophila melanogaster.* Rev. suisse Zool. 60: 506.

Hunter, R. L. und C. L. Markert. 1957. *Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels.* Science 125: 1294.

Laven, H. und P. S. Chen. 1956. *Genetische und papierchromatographische Untersuchungen an einer letalen Mutante von Culex pipiens.* Z. Naturforschg. 11 b: 273.

Smithies, O. 1955 *a*. *Grouped variations in the occurence of new protein components in normal human serum.* Nature 175: 307.

— 1955 *b*. *Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults.* Biochem. J. 61: 629.

— und M. D. Poulik. 1956. *Two-dimensional electrophoresis of serum proteins.* Nature 177: 1033.

— und N. F. Walker. 1955. *Genetic control of some serum proteins in normal humans.* Nature 176: 1265.

— und — 1956. *Notation for serum-protein groups and the genes controlling their inheritance.* Nature 178: 694.

Stumm-Zollinger, E. 1954. *Vergleichende Analyse der Aminosäuren und Peptide in der Hämolymphe des Wildtyps und der Mutante „letal-translucida" (ltr) von Drosophila-melanogaster.* Z. Vererbungslehre 86: 126.

Wunderly, Ch. 1957. *Die Immunoelektrophorese in Agar-Gel: Methode und Ergebnisse.* Experientia 13: 421.

— und H. Gloor. 1953. *Versuche zur Charakterisierung der larvalen Blutproteine normaler und letaler Genotypen von Drosophila mittels Papier-Elektrophorese.* Protoplasma 42: 273.

N° 13. E. Ernst, Basel. — *Beobachtungen beim Spritzakt der Nasutitermes-Soldaten.* (Mit 1 Textabbildung.)

Schweizerisches Tropeninstitut Basel.

Die Kolonien der Termiten setzen sich aus verschiedenen Kasten zusammen, die entsprechend ihren morphologischen Eigenschaften bestimmte Funktionen innerhalb des Staates ausüben. Die Kaste der Soldaten, welche nur bei der Gattung *Anoplotermes* fehlt, zeichnet sich durch die stärker pigmentierte, dickere und infolgedessen härtere Kopfkapsel, sowie durch die weitgehend umgestalteten Mandibeln aus. Die Form- und Grössenunterschiede der Soldatenköpfe werden als arttypische Merkmale in der Systematik zur Bestimmung herangezogen. Es existieren zwei Haupttypen von Soldaten: Die „Kiefersoldaten", wie sie bei den meisten Termitengruppen vorkommen, tragen zwei kräftig ausgebildete, zangenförmige Mandibeln. Die „Nasensoldaten" besitzen rudimentäre Mandibeln und eine wohlentwickelte Frontaldrüse, welche den ganzen Hinterteil des Kopfes ausfüllt; dieser ist kolbenförmig und mündet in eine sich zuspitzende Kanüle, das sog. Rostrum, aus (siehe Abb.). Diese evoluierten *Nasuti*-Soldaten sind charakteristisch für einige *Nasutitermitinae*-Gattungen (*Nasutitermes*, *Trinervitermes*, *Hospitalitermes* usw.).

Im Rahmen der Arbeitsteilung dienen die Soldaten ausschliesslich zum Schutz und zur Verteidigung des Termitenstaates vor Feinden. Die Hypertrophie oder Atrophie ihrer Mandibeln verunmöglicht den Soldaten jegliche selbständige Nahrungsaufnahme; sie sind somit auf die Fütterung durch die Arbeiter absolut angewiesen. Ihr instinktives Verhalten richtet sich ganz auf die sinnvolle